

iGEM 2016 – SDU

Title: Impact_Purification

Date issued: 2016.09.17

SOP number: SOP0025_v01

Review date: 2016.10.05'

Version number: 01

Written by: Brian Kenn Baltzar

1. Purpose

To purify protein using NEB impact system

2. Area of application

3. Materials and reagents – their shelf life and risk labelling

Name	Components (Concentrations)	Manufacturer / Cat. #	Room	Safety considerations
Falcon Tubes				
Pipette tips		Contact Lab-manager	Micro storage	
Tris-base			Micro Chem	
dH ₂ O				
Tris-HCl 1M				
NaCl 5M				
EDTA 0,5M				
Tween 20				
DTT 1M				
Bio-Rad Filter Columns				
Bio-Rad Econo-Pac 10DG columns				
Chitin Beads				

4. QC – Quality Control

5. List of other SOPs relevant to this SOP

JMJ_SOP0001 ON culture of E.coli

iGEM 2016 SOP0024_v01 - SDS-page

iGEM 2013 SOP0021 - Colony PCR with My Tag

iGEM 2014 SOP0010 - Phusion PCR

iGEM 2014 SOP0009 - TSB Transformation

6. Environmental conditions required

7. Considerations

7.1 Make sure that the desired protein has the correct restriction sites and is in frame with the intein in the purification vector.

7.1.1 If that is not the case natively, design primers using the sequences in the following table.

RESTRICTION SITE	SEQUENCE (RESTRICTION SITE UNDERLINED)	CLONING VECTOR
NdeI	5'- GGT GGT <u>CAT ATG</u> NNN NNN... -3' (forward primer)	pTXB1
SapI ¹	5'- GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> GCA NNN NNN...-3' (reverse primer)	pTXB1
SapI ²	5'- GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> AAC NNN NNN... -3' (forward primer)	pTYB21
PstI ³	5'- GGT GGT <u>CTG CAG</u> TCA NNN NNN... -3' (reverse primer)	pTYB21

¹ SapI digestion creates a 3-nt overhang (GCA) for ligation with the SapI-digested pTXB1 vector (containing a TGC overhang), resulting in an in-frame fusion to the N-terminus of an intein. The SapI site can be used to add one or more extra amino acid residue(s) to the target protein by including an appropriate sequence (e.g. add ACC in the reverse primer corresponding to a GGT codon for a glycine residue). The SapI site is not regenerated after cloning.

² SapI digestion creates a 3-nt overhang (AAC) compatible with the SapI digested pTYB21 (containing a GTT overhang). The SapI site is not regenerated after cloning.

³ A stop codon should be included in the reverse primer when constructing a N-terminal fusion.

7.1.2 Then perform a Phusion PCR with the designed primers, using SOP: *iGEM 2014 SOP0010 - Phusion PCR*

8. Procedure

8.1 Indsæt gen i Impact vector

- 8.1.1 Skær pPCR produkt med NdeI og SapI i mindst 2 timer (Brug SOP: iGEM 2014 SOP0017 - Fast Digest)
- 8.1.2 Skær Vector (pTXB1) med NdeI og SapI i mindst 2 timer (Brug SOP: iGEM 2014 SOP0017 - Fast Digest)
- 8.1.3 Oprens FD skæringer
- 8.1.4 Liger Skæringer (Brug SOP: iGEM 2014 SOP0015 - Ligation)
- 8.1.5 Transformer ind i E. Coli:K-12 (Brug SOP:iGEM 2014 SOP0009 - TSB Transformation)
- 8.1.6 Tjek ligering med cPCR (SOP0021)
- 8.1.7 Lav ON af ovenstående transformation
- 8.1.8 Lav Freeze-stock af ovenstående ON
- 8.1.9 Oprens plasmid ON fra pkt. 8.1.6

8.2 Udtryk protein

- 8.2.1 Transformer ovenstående plasmidoprensning ind i E. Coli:ER2566
- 8.2.2 Pod 1L LB+Amp med en frisk koloni fra ovenstående transformation
 - 8.2.2.1 Inkuber ved 37°C indtil der er en OD₆₀₀ på ~ 0.5.
 - 8.2.2.2 Tilføj IPTG til de 1L (opnå en slut koncentration IPTG på 0.4 mM)
- 8.2.3 Inkuber ved 16-20 °C natten over.
- 8.2.4 Centrifuger den 1L ON ved 5000G i 15 min. ved 4°C. - Fjern supernatanten.
- 8.2.5 Cellepellet resuspenderes i 100 ml iskold column buffer
- 8.2.6 Centrifuger ved 8000G i 20 min. ved 2°C - Fjern supernatanten
- 8.2.7 Resuspender i så lille et volumen, iskold column buffer, som muligt (1-2 mL)
- 8.2.8 Lyser celler ved Fransk presse
- 8.2.9 Centrifuger cellerne ved 15.000G i 30 min ved 4°C

8.3 Binding til Chitin beads

- 8.3.1 10 ml Chitin beads udtages til et Falcon rør
- 8.3.2 Centrifuger ved 200G i 5 min - Fjern supernatant
- 8.3.3 Vask med 100 mL Column Buffer
- 8.3.4 Centrifuger ved 200G i 5 min - Fjern supernatant
- 8.3.5 Load supernatanten (clarified cell extract) fra pkt. 8.2.12
- 8.3.6 Fastgør på roter med langsom rotering i 2 timer
- 8.3.7 Tilføj til collum, åben for ventil så det langsomt drypper og tilføj så 200 mL Column Buffer.
- 8.3.8 Når røret er dryppet tør lukkes der for ventil og der hældes Cleavage Buffer på, (nok til at det dækker beads + 1 mL)
- 8.3.9 Lad stå ved stuetemperatur i mindst 16 timer

8.4 Eluering af protein

- 8.4.1 Åben ventil og dryp eluat ned i eppendorfrør - 0.5 mL i hvert.
- 8.4.2 Mål protein koncentration vha. SOP0028_v01
- 8.4.3 De 3-4 prøver der viser størst koncentration pooles og bruges til det videre forløb.

9. Waste handling

